

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-261281

(43)Date of publication of application : 12.10.1993

(51)Int.Cl.

B01J 20/26

A61K 37/24

A61K 37/48

A61K 39/44

B01D 15/08

(21)Application number : 04-097109

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 23.03.1992

(72)Inventor : INAMORI KAZUNORI

SEKO MASAHIRO

YOKOTA HIDEYUKI

TANAKA MASAKAZU

(54) CARRIER FOR IMMOBILIZING BIOACTIVE SUBSTANCE AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide the method for immobilizing bioactive substance to a water-insoluble carrier without deactivating or modifying the activity and the carrier for immobilizing the bioactive substance by reacting sugar chains of glycoproteins or glycopeptides having biological activity.

CONSTITUTION: A bioactive substance having sugar-chain bonds is immobilized to a water-insoluble carrier by forming a Schiff base by the reaction of aldehyde group formed by the chain-cleavage of the glycol part of the sugar chain in the bioactive substance with the water-insoluble carrier bonded with poly (oxyethylene) of 10-50 polymn. degree having amino groups on both ends as a hydrophilic spacer, and then reducing the Schiff base. Thus, the carrier for immobilizing bioactive substance is obtd.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-261281

(43) 公開日 平成5年(1993)10月12日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 J 20/26	H	7202-4G		
A 6 1 K 37/24		8314-4C		
37/48		8314-4C		
39/44		8413-4C		
B 0 1 D 15/08				

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平4-97109	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成4年(1992)3月23日	(72) 発明者	稲森 和紀 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	世古 政弘 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	横田 英之 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生理活性物質固定化担体とその製法

(57) 【要約】

【目的】 生理活性を有する糖タンパク質あるいは糖ペプチドにおける糖鎖部位を反応させることにより、活性を失活させたり変性させたりすることのない水不溶性担体への固定化方法および生理活性物質固定化担体を提供する。

【構成】 糖鎖の結合した生理活性物質における糖鎖のグリコール部位の開裂により形成されたアルデヒド基を、重合度10から50である両末端にアミノ基を有するポリ(オキシエチレン)を親水性スパーサーとして結合した水不溶性担体と、シッフ塩基を形成させた後これを還元することによる糖鎖の結合した生理活性物質の固定化方法および生理活性物質固定化担体。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生理活性を有する糖タンパク質または糖ペプチドが、水不溶性担体に親水性スパーサーを介して、糖鎖の部位において固定されていることを特徴とする生理活性物質固定化担体。

【請求項2】 生理活性を有する糖タンパク質または糖ペプチドの糖鎖におけるグリコール部位の開裂により形成されたアルデヒド基を、アミノ基を末端に有する親水性スパーサーの結合した水不溶性担体とシッフ塩基を形成させた後これを還元することを特徴とする生理活性物質固定化担体の製法。

【請求項3】 親水性スパーサーが重合度10ないし500である両末端にアミノ基を有するポリ（オキシエチレン）である請求項第2項記載の生理活性物質固定化担体の製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は生理活性を有する糖タンパク質または糖ペプチドの水不溶性担体への固定化方法および生理活性物質固定化担体に関するものであり、生理活性物質における糖鎖のグリコール部位の酸化による開裂により形成したアルデヒド基を、アミノ基を末端に有する親水性スパーサーの結合した水不溶性担体とシッフ塩基を形成させ、さらにこれを還元することを特徴とするものである。

【0002】この方法はその生理活性の失活あるいは変性を生ずることなく、また活性部位をブロックすることのない効果的な固定化方法である。特定の物質を吸着除去することを目的とした吸着材、特定の化学反応を利用したバイオセンサーやエンザイムイムノアッセイによる物質の定量、あるいは連続的に特定の化学反応を行なわせるバイオリアクターなど実に広範囲な領域において応用が可能なものである。

【0003】

【従来の技術】酵素、抗体、ホルモン、レクチンなど生理活性を有する種々の糖タンパク質や糖ペプチドを担体に、場合によってはスパーサーを介して固定化を行なう試みについては、特に酵素に関して古くから多くの報告例がある。その大部分はタンパク質を構成しているアミノ酸残基の官能基における反応に方法ものである。たとえばリジンのε-アミノ基、N末端のアミノ基、システインのスルフヒドリル基、アスパラギン酸のβ-カルボキシル基、グルタミン酸のγ-カルボキシル基、C末端のカルボキシル基、チロシンのフェノール性水酸基、セリンあるいはトレオニンの水酸基、アルギニンのグアニジノ基、ヒスチジンのイミダゾリル基、トリプトファン

2

の活性を低下あるいは失活させる場合が多い。

【0004】また一般にこうしたタンパク質系の生理活性物質は、通常の化学合成において頻繁に用いられる熱、酸、アルカリ、有機溶媒などの作用により変性を受けやすい。したがってリガンドである生理活性物質が固定化前と同等にできる限り近い物理的あるいは化学的性質を保持できるようにするには、固定化反応条件において様々な面で制約が多くなる。

【0005】また固定化されたリガンドが種々の塩濃度や広いpH範囲においてもしっかりと固定化されリガンドの漏出が起らないことや、固定化されたリガンドが目的とする物質と強固に結合できることなどが条件となる。種々の生理活性物質の固定化方法を原理的に大別すると担体結合法、架橋法、包括法の3種類である。これらの方法はそれぞれ長所、短所を有しており、リガンドの種類や目的に応じて使い分けられている。

【0006】タンパク質には反応性の強いアミノ酸残基やイオン性のアミノ酸残基、疎水的な部分を含んでいる。これらのうちで生理活性の発現に可能な限り悪影響を与えない部分の特に水酸基、カルボキシル基、アミノ基を選択して、担体に共有結合、イオン結合、疎水結合、生化学的特異結合などを介して固定化するものが担体結合法である。共有結合による固定化には臭化シアンによる活性化、カルボン酸のアジド誘導体化、カルボジイミド試薬やWoodward試薬Kなどによる縮合反応、ジアゾカップリング反応、グルタルアルデヒドのような2つ以上の反応性に富む官能基を有する化合物により架橋する方法などがある。これらの方法は結合が強固であり、安定性を増す場合があるなどの長所があるが、タンパク質の変性の恐れや、目的物質との相互作用が起りにくくなる場合があるなどの短所がある。

【0007】特開昭58-53757にはさらに炭水化物部位を酸化切断し、アルデヒド基を有する抗体と側鎖にアミノ基またはヒドラジド基を有する担体とが、 $-CH_2-NH-$ または $-CH_2-NH-NH-CO-$ の構造を介して固定化する方法が記載されている。しかしこの方法においても、担体と抗体の結合が直接的であるため、抗体の機能を十分に保持し固定化することが困難である。また他のタンパク質の非特異的吸着を防止できない。

【0008】またイオン結合による固定化は操作の簡便さや再生の可能な点が有利であるが、反応液に用いる緩衝液の種類、pH、イオン強度、温度などの影響を受けやすい。物理的吸着による固定化では結合が一般に弱いことが多い。

【0009】架橋法はグルタルアルデヒド、トルエンジイソシアナート、ヘキサメチレンジイソシアナート、シアヌルクロリドなどの2つ以上の官能基を有する試薬とリガンドを反応させて分子間で架橋させて巨大分子とする方法である。この方法は微生物菌体の固定化にはしば

3

しば用いられるが、タンパク質系の生理活性物質の固定化にはあまり有効なものではない。

【0010】包括法は高分子ゲル内にリガンドを閉じ込める方法である。これにはタンパク質や多糖類のような天然高分子あるいは種々の合成高分子のゲルの内部にリガンドを閉じ込める格子型、半透膜性の高分子被膜によりリガンドを包み込むマイクロカプセル型、リン脂質のような液体膜にリガンドを包み込むリポソーム型などがある。また中空子膜内や限外濾過膜で仕切られた空間中にリガンドを閉じ込める方法もある。これらの方法は固定化によりリガンドの修飾が起りにくく、自然な状態を保ったまま固定化が可能である長所があるが、高分子量の物質の作用を受けにくいことや条件により失活が起こるなどの欠点がある。

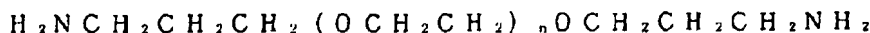
【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記の従来技術における種々の欠点を解決し、生理活性を有する糖タンパク質あるいは糖ペプチドを効率よく、しかもその生理活性を低下させたり変性させたりする可能性をできる限り小さくした生理活性物質の固定化方法を提供しようとするものである。また本発明における固定化技術は極めて広範囲な分野において適用されうるものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成した本発明による固定化方法は生理活性を有する糖タンパク質あるいは糖ペプチドにおいてその糖鎖部分を修飾してアルデヒド基を導入したものを、アミノ基を末端に有する親水性スパーサーの結合した水不溶性担体とシッフ塩基を形成させさらに還元することにより固定化反応を行なうことを要旨とするものである。本発明は結合している糖鎖部分がその活性発現に強く関与しない糖タンパク質や糖ペプチドであれば、酵素、抗体、ホルモンなどの種類を問わずあらゆるタイプの物質への適用が可能である。

【0013】本発明における生理活性を有する糖タンパク質あるいは糖ペプチドとは特にその種類は限定されないが、糖鎖の結合部位を有している酵素、抗体、ホルモン、レクチン、受容体をはじめ生体内に存在する免疫現象、細胞接着などに関与している様々なタンパク質系の生理活性物質を含んでいる。これらの糖タンパク質や糖ペプチドにおける糖鎖部分の生化学的な意義や役割は詳細には解明されていないがそれぞれに特有で様々である*



【0017】一方リガンドである糖タンパク質や糖ペプチドにおける糖鎖部分へのアルデヒド基の導入は過ヨウ素酸またはその塩で酸化して、グリコール部位を開裂してアルデヒド基を形成させることにより行なうのが好ましい。過ヨウ素酸による酸化反応はグリコール部位の隣接する水酸基間で生ずるものであり、1モルの104-が

4

*と考えられており、一般的には熱、各種変性剤、分解酵素（プロテアーゼ）などに対する安定性を高めたり防御したりする作用や、あるいは高次構造の維持に関与する場合が多いとされている。しかしその生理活性の発現に関しては、大きく影響していると考えられる場合はほとんどなく、糖鎖部分を修飾することによる生理活性の変化に対する影響はタンパク質部分を構成しているアミノ酸残基を修飾する場合と比較すれば小さいものである。

【0014】また水不溶性担体としては、アミノ基と反応性のあるたとえばアルデヒド基、エポキシ基のような官能基を有しているか、あるいは修飾することによりこれらの官能基が導入されており、しかもその目的に応じたゲル強度、粒子径、細孔径などの特徴を有していれば特に限定されるものではないが、たとえばセルロース、架橋ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリスチレンおよびその誘導体などが挙げられる。担体の形態に関しても特に限定されるものではなく、その用途や目的に応じてビーズ状、繊維状、膜状（中空糸膜を含む）などいずれにおいても適用できるものである。これらの担体に親水性スパーサーとして後記の化1に示すような両末端にアミノ基を有するポリ（オキシエチレン）（以下PEOアミンと言う）を結合させたものに、さらに上記のような生理活性物質をリガンドとして導入する。

【0015】担体におけるアミノ基の含量はある程度多い方がリガンド導入率の向上に結びつくが、あまり多過ぎるとゲル強度が低下するので適当ではない。したがって0.01ないし0.80meq/gの範囲になるように導入するのが望ましく、リガンドや目的物質の大きさに応じてその値を調整する必要がある。親水性スパーサーの鎖長（化1のnに相当する）についてもリガンドに結合させる目的物質の大きさや性質に応じて適当に調整する必要があるが、重合度が10ないし500の範囲、好ましくは30ないし400、さらに好ましくは100ないし300の両末端にアミノ基を有するポリ（オキシエチレン）を用いるのが適している。親水性スパーサーを導入することにより立体障害が小さくなり、目的物質との結合性を大きく向上させることができる。さらに親水性スパーサーの排除体積効果および親水性の向上により、非特異的な吸着を抑えることができる。

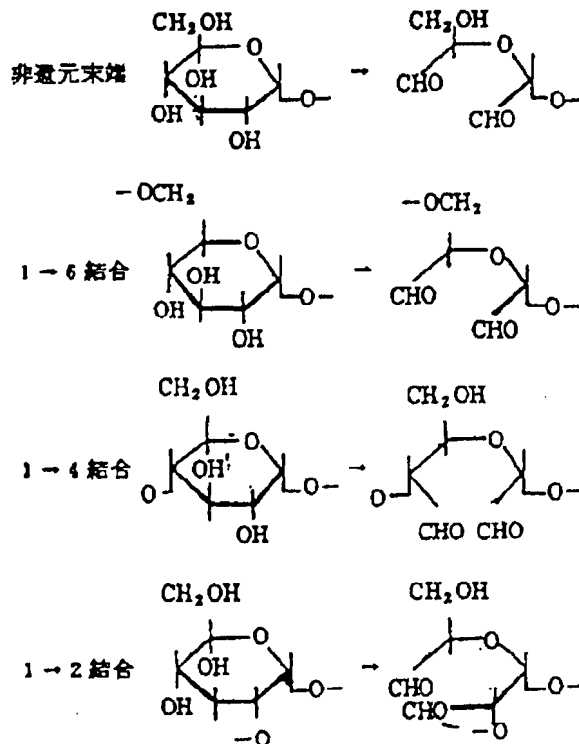
【0016】

【化1】

103-に還元されことにより2モルのアルデヒド基が形成される。得られる反応物の構造はグルコシド結合の種類により異なってくるが、化2に示すようなものが考えられる。

【0018】

【化2】



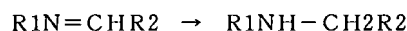
【0019】過ヨウ素酸の量は酸化する物質と同モル以上の過剰量を用いて反応させるのが望ましい。反応時のpH値はリガンドとして導入する物質の安定性や副反応の発生しやすさにより最適値は異なってくるが、pH3ないし6で行なうのが好ましく、pH4ないし5で行なうのがより好ましい。また反応液には0.1M程度の酢酸あるいはクエン酸緩衝液を用いるのが適当である。反応温度は室温あるいはそれ以下が好ましく、室温で不安定な物質の場合は5℃で行なうのが理想的である。反応時間は室温では1時間以内で十分であるが、5℃では12時間ないし24時間程度行なう必要がある。

【0020】また酸化反応終了後にはエチレングリコール、グリセリン、亜硫酸ナトリウムなどの物質を添加して過剰の酸化剤を除去する必要がある。また酸化反応の際に用いた緩衝液を外液として、透析処理を5℃で12時間以上行なうことによりこれらの物質を除去するのがより好ましい。

【0021】こうして得たアルデヒド基の導入されたりリガンドを、上記のようなPEOアミンの結合した担体とシッフ塩基を形成させて結合する。この反応は室温または5℃で10時間ないし30時間、pHは6ないし10の範囲で行ないpH8ないし9.5の範囲で行なうのがより望ましい。反応液としては0.1M程度の炭酸緩衝液を用いるのが好ましい。

【0022】こうして得られたシッフ塩基は安定性に乏しく、特に酸性あるいはアルカリ性の条件下では分解を受けやすい。そこで次式に示すように(R1を担体、R2をリガンドとする)、還元反応を行なうことにより安定

化させるのが適当である。



【0023】シッフ塩基の還元反応は水素化ホウ素ナトリウム(NaBH4)あるいはシアノ水素化ホウ素ナトリウム(NaBH3CN)の添加により行なうのが好ましい。反応は室温または5℃において、pH8ないし9の炭酸緩衝液中で3時間ないし30時間行なうのが望ましい。

【0024】本発明におけるアミノ基を末端に有する親水性スパーサーの結合した水不溶性担体に、糖鎖にアルデヒド基を導入した糖タンパク質あるいは糖ペプチドをリガンドとして導入するには、上記のような方法を基本とすれば特に限定されるものではないが、たとえばセルロースを担体として抗体を導入する場合には、以下の方法が好ましい。

【0025】(1)セルロースの改質

過ヨウ素酸ナトリウムを0.1ないし5.0規定、好ましくは0.5ないし1.5規定の硫酸に溶解した溶液に平均粒子径が20ないし2000μm、平均細孔径が200ないし3000μmの粒状多孔質セルロースを添加し、10℃から50℃好ましくは20℃から30℃で5時間から30時間好ましくは10時間から24時間反応させる。上記過ヨウ素酸ナトリウム-硫酸溶液の過ヨウ素酸ナトリウム濃度は2重量%から15重量%好ましくは4重量%から10重量%である。また上記粒状多孔質セルロースの過ヨウ素酸ナトリウム溶液への浴比は10容量%から30容量%好ましくは15容量%から25容量%である。

7

【0026】この反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して、膨潤状態でアルデヒド含量0.10ないし4.00meq/g好ましくは0.20ないし1.00meq/gの【アルデヒド】—【セルロース】を得る。この【アルデヒド】—【セルロース】は先に化2に示したような一部のグルコースユニットが開環した構造を有している。

【0027】(2) 親水性スパーサーの導入
化1に示したような重合度が10ないし500、好ましくは30ないし400、さらに好ましくは100ないし300のPEOアミンをpH9.5の炭酸緩衝液に溶解しておく。これに上記(1)で得た【アルデヒド】—【セルロース】を添加して攪拌しながら10℃から50℃好ましくは20℃から30℃で、5時間から30時間好ましくは10時間から24時間反応させる。上記PEOアミンの濃度は0.2重量%から5.0重量%好ましくは0.4重量%から3.0重量%で、この溶液への【アルデヒド】—【セルロース】の浴比は3容量%から20容量%好ましくは5容量%から15容量%である。この反応混合物を濾過して生成物を回収、水洗して【PEOアミン】—【セルロース】を得る。

【0028】(3) 抗体における糖鎖の改質
ウサギにヒトアルブミン（以下hA1bと言う）を免疫して得られた抗血清を硫酸塩析により精製して得た抗hA1b抗体10ないし20mgを、20ないし50mlのpH4.0の酢酸緩衝液に溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム1ないし5mgを添加して室温で攪拌して30分ないし1時間反応させる。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して5℃で5時間ないし10時間反応させ、この反応液を上記酢酸緩衝液を外液として5℃で12時間ないし24時間透析を行なった。こうして【アルデヒド】—【抗体】溶液を得る。

【0029】(4) 抗体の導入
上記(3)で得た【アルデヒド】—【抗体】溶液にpH9.5の炭酸緩衝液を加えてpHを8.0ないし9.0に調整した後に、上記(2)で得た【PEOアミン】—【セルロース】3g（膨潤状態）を添加し、5℃で20時間ないし30時間反応させてシッフ塩基を形成させる。この反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して、膨潤状態でpH9.0の炭酸緩衝液を加え、さらに水素化ホウ素ナトリウムを0.2ないし1g添加して5℃で5時間ないし15時間攪拌により還元反応を行なった。この反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄することにより、抗hA1b抗体をPEOアミンをスパーサーとして介してセルロースに固定化したものを得る。

【0030】

【実施例】以下実施例を用いて本発明を説明する。

<実施例1> インペルターゼの固定化

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 50

8

e) 由来であり、その培養液をゲル濾過、アニオンおよびカチオン交換カラムにより精製して凍結乾燥して得られたインペルターゼ (β -D-フルクトフラノシダーゼ) のセルロースへの固定化を次のようにして実施した。

【0031】過ヨウ素酸ナトリウム400mgを1N硫酸50mlに溶解して、多孔質セルロース（チッソ製セルロファインGCL-1000m）5gを添加し、攪拌により20時間反応させた後、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【アルデヒド】—【セルロース】を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行ない0.97meq/gであった。

【0032】分子量600のPEOアミン20gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記の【アルデヒド】—【セルロース】全量を加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEOアミン】—【セルロース】を得た。アミノ基含量は塩酸による電位差滴定（平沼産業製COM TITE101を使用）により定量を行ない、0.31meq/gであった。

【0033】一方上記インペルターゼ30mgをpH4.5のクエン酸緩衝液に50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにグリセリンを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析を行ない【アルデヒド】—【酵素】溶液を得た。

【0034】上記【アルデヒド】—【酵素】液を炭酸緩衝液を添加してpHを8.0に調整し、上記【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて、5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化インペルターゼを得た。インペルターゼ固定化量はシッフ塩基反応の残液をトリクロロ酢酸溶液により沈殿させ、水酸化ナトリウム水溶液に溶解したものをBCAタンパク質定量用試薬（ピアス社製）により残存量を定量することにより算出したところ（以下TCA-BCA法と言う）、18.5mgが固定化されていた。

【0035】酵素活性の定量は0.1%濃度のスクロースクエン酸緩衝液（pH5.5）溶液中にて、上記固定化インペルターゼを固定化量が1mgに相当するように懸濁して30℃で30分間反応をさせることにより実施した。反応液中の分解物であるグルコース、フルクトース濃度をアミノ基を有する順相系カラムを用いた高速液体クロマトグラフィ（島津製作所製LC-6Aシステム）により定量した。結果は表1に示す通りである。なお固定化していない遊離状態のインペルターゼ1mgに

における同様の実験結果におけるグルコースおよびフルクトースの量を100として表示している。 * 【0036】 * 【表1】

	グルコース	フルクトース
遊離インペルターゼ	100	100
実施例1	99	98
比較例1	64	65

【0037】また本酵素の熱安定性に関する影響について、上記固定化酵素懸濁液を55℃で処理した際の残存活性を上記と同様にして定量することにより検討した。結果は図1に示す通りである。残存活性は遊離状態でpH5.5における30℃において反応させて生成したグルコース量を100%として表示した。

【0038】＜実施例2＞ 抗mIgG（マウス免疫グロブリン）抗体の固定化
mIgG（カッセル社製）を免疫したウサギ抗血清を硫酸塩析により精製して得た抗mIgG抗体のセルロースへの固定化を次のようにして実施した。

【0039】過ヨウ素酸ナトリウム200mgを1N硫酸50mlに溶解して、多孔質セルロース（チッソ製セルロファインGCL-1000m）5gを添加し、攪拌により20時間反応させた後、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【アルデヒド】—【セルロース】を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行ない0.43meq/gであった。

【0040】分子量1000のPEOアミン4gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記の【アルデヒド】—【セルロース】全量を加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEOアミン】—【セルロース】を得た。アミノ基含量は塩酸による電位差滴定により定量を行ない、0.22meq/gであった。

【0041】一方上記抗体20mgをpH3.8のクエン酸緩衝液に50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析を行ない【アルデヒド】—【抗体】溶液を得た。

【0042】上記【アルデヒド】—【抗体】液を炭酸緩衝液を添加してpHを9.0に調整し、上記【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて、5℃で30時間

攪拌して Schiff 塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化抗体を得た。抗体の固定化量は実施例1と同様にして、BCAタンパク質定量用試薬により残存量を定量することにより算出し、17.1mgが固定化されていた。

【0043】上記抗体を固定化したセルロースゲル1mlをオープンカラム管に充填して、抗原であるmIgGをpH8.0の50mMリン酸緩衝液に0.2%濃度で溶解して10mlをカラムに供した。カラム通過液の抗体濃度をTCA-BCA法により定量して、吸着しなかったmIgG量からカラムへの吸着率を算出した。結果は表2に示す通りである。

【0044】

【表2】

実施例2	80.1%
比較例2	55.4%

40 【0045】＜実施例3＞ 抗hLDL（ヒト低比重リポタンパク質）抗体の固定化

hLDL（ケミコン社製）を免疫したウサギ抗血清を硫酸塩析により精製して得た抗hLDL抗体のセルロースへの固定化を次のようにして実施した。過ヨウ素酸ナトリウム200mgを1N硫酸50mlに溶解して、多孔質セルロース（チッソ製セルロファインCPCm）5gを添加し、攪拌により20時間反応させた後、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【アルデヒド】—【セルロース】を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行ない0.55meq/gであつ

た。

【0046】分子量5000のPEOアミン2gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記の【アルデヒド】—【セルロース】全量を加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEOアミン】—【セルロース】を得た。アミノ基含量は塩酸による電位差滴定により定量を行ない、0.20meq/gであった。

【0047】一方上記抗体40mgをpH3.8のクエン酸緩衝液に50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析処理を行ない【アルデヒド】—【抗体】溶液を得た。

【0048】上記【アルデヒド】—【抗体】液を炭酸緩衝液を添加してpHを9.0に調整し、上記【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて、5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化抗体を得た。抗体の固定化量は実施例1と同様に、BCAタンパク質定量用試薬により残存量を定量することにより算出し、27.9mgが固定化されていた。

【0049】上記抗体を固定化したセルロースゲル1mlをブタ血清(LDL値150.5mg/ml)3mlと20mlのバイアル中で混合して、30℃で30分間振盪することによりインキュベートして、遠心分離のLDL値をβリポ蛋白Cテストワコー(和光純薬工業製)により定量した。得られた残存LDL値からLDL吸着率を算出した結果を表3に示す。

【0050】

【表3】

実施例3	68.7%
比較例3	24.1%
比較例4	13.4%

【0051】＜実施例4＞ 小麦胚芽レクチン(WGA)の固定化

WGA(ベクターラボラトリー社製)のセルロースへの固定化を次のようにして実施した。過ヨウ素酸ナトリウム100mgを1N硫酸50mlに溶解して、多孔質セ

ルロース(チッソ製セルロファインGCL-1000m)5gを添加し、攪拌により20時間反応させた後、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【アルデヒド】—【セルロース】を得た。アルデヒド含量はオキシム法により定量を行ない0.22meq/gであった。

【0052】分子量1000のPEOアミン4gをpH9.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記の【アルデヒド】—【セルロース】全量を加えて攪拌により反応させて、反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【PEOアミン】—【セルロース】を得た。アミノ基含量は塩酸による電位差滴定により定量を行ない、0.15meq/gであった。

【0053】一方上記WGA20mgをpH4.5のクエン酸緩衝液に50mlに溶解して、過ヨウ素酸ナトリウム50mgを添加して、攪拌により室温で45分反応させた。さらにエチレングリコールを0.1M濃度になるように添加して、5℃で7時間攪拌して反応させ、反応液を上記緩衝液を外液として5℃で一晩透析処理を行ない【アルデヒド】—【レクチン】を得た。上記【アルデヒド】—【レクチン】液を炭酸緩衝液を添加してpHを8.5に調整し、上記【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて、5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化レクチンを得た。レクチンの固定化量は、BCAタンパク質定量用試薬により残存量を定量することにより算出し、13.7mgが固定化されていた。

【0054】上記WGAを固定化したセルロースゲル1mlをオープンカラム管に充填して、mlgGをpH8.0の50mMリン酸緩衝液に0.2%濃度で溶解して10mlをカラムに供した。カラム通過液の抗体濃度をTCA-BCA法により定量して、吸着されなかったmlgG量からカラムへの吸着率を算出した。結果は表4に示す通りである。

【0055】

【表4】

実施例4	61.7%
比較例5	13.4%

【0056】＜比較例1＞ インベルターゼの固定化
実施例1におけるインベルターゼ30mgをpH8.0の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例1において調

13

整した【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化インペルターゼを得た。インペルターゼ固定化量は実施例1と同様にして求め、21.3mgが固定化されていた。酵素活性およびその熱安定性について実施例1と同様にして行なった。結果は表1および図1に示す通りである。

【0057】＜比較例2＞ 抗mIgG抗体の固定化
実施例2における抗mIgG抗体20mgをpH9.0の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例2において調整した【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化抗体を得た。抗体の固定化量は実施例2と同様にして求め、18.3mgが固定化されていた。実施例2と同様のカラムを作製して、mIgG吸着率を求めた。結果は表2に示す通りである。

【0058】＜比較例3＞ 抗hLDL抗体の固定化
実施例3における抗hLDL抗体40mgをpH9.0の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例3において調整した【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化抗体を得た。抗体の固定化量は実施例2と同様にして求め、35.1mgが固定化されていた。実施例3と同様にして、ブタ血清におけるLDL吸着率を求めた。結果は表3に示す通りである。

【0059】＜比較例4＞ 抗hLDL抗体の固定化
実施例3と同様にして、CPCm5gを酸化してアルデヒド含量0.50meq/gの【アルデヒド】—【セルロース】を調製した。さらにこれに28%アンモニア水

14

50mlを加えて室温で8時間反応させ、濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して【アミノ】—【セルロース】を得た。アミノ基含量は塩酸による電位差滴定により定量を行ない、0.28meq/gであった。

【0060】一方実施例3における抗hLDL抗体40mgをpH9.0の炭酸緩衝液50mlに溶解して、上記【アミノ】—【セルロース】1gを加えて5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化抗体を得た。抗体の固定化量は実施例2と同様にして求め、35.1mgが固定化されていた。実施例3と同様にして、ブタ血清におけるLDL吸着率を求めた。結果は表3に示す通りである。

【0061】＜比較例5＞ WGAの固定化
実施例4におけるWGA20mgをpH8.5の炭酸緩衝液50mlに溶解して、実施例1において調整した【PEOアミン】—【セルロース】1gを加えて5℃で30時間攪拌してシッフ塩基を形成させた。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄してpH8.0の炭酸緩衝液50ml、水素化ホウ素ナトリウム200mgを加えて5℃で7時間還元反応を行なった。反応混合物を濾過して生成物を回収し、十分に洗浄して固定化レクチンを得た。レクチンの固定化量は実施例2と同様にして求め、15.9mgが固定化されていた。実施例4と同様のカラムを作製して、mIgG吸着率を求めた。結果は表4に示す通りである。

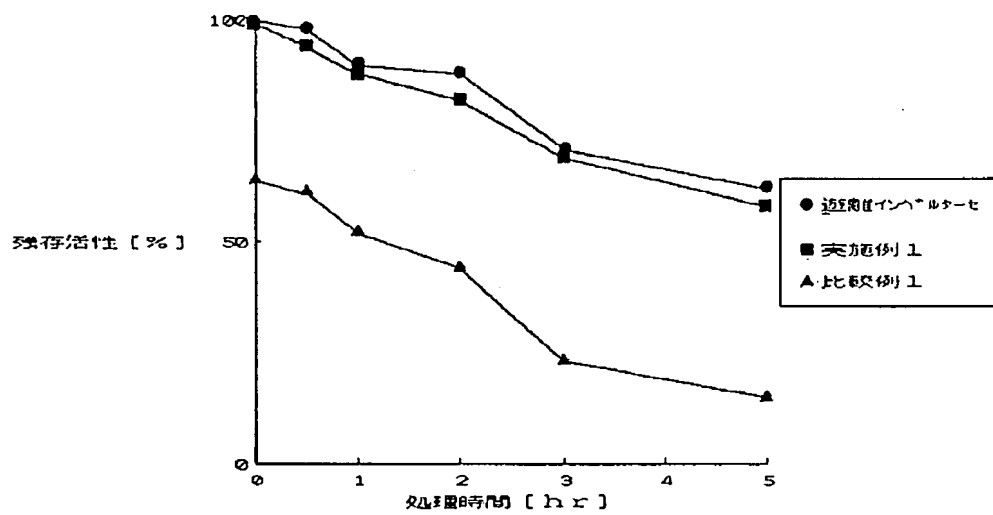
【0062】

【発明の効果】本発明により、種々の糖鎖の結合した生理活性物質をその活性を失活させたりあるいは変性させたりすることなく水不溶性担体に固定化することが可能となり、固定化前に近い活性を維持した生理活性物質固定化担体を提供することが可能となった。本発明は吸着材、アフィニティクロマト用担体、バイオセンサー、エンザイムイムノアッセイ、バイオリアクターなどをはじめ広範囲な領域において有用なものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1と比較例1の熱安定性を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 田中 昌和
滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡
績株式会社総合研究所内